

THESIS

MUNICH

1967

Enzymatischer Nachweis von Fruchtwasser

MICHAEL / INBAR

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF 94304



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153305_0023

Aus der 1. Frauenklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. WERNER BICKENBACH

ENZYMATISCHER NACHWEIS VON FRUCHTWASSER

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

MICHAEL INBAR

aus

Tel-Aviv / Israel

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes.

Mit Genehmigung, der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Dekan:	Professor Dr. M. Kiese
Berichterstatter:	Professor Dr. G. Martius
Mitberichterstatter:	Professor Dr. W. Bickenbach
Tag der mündlichen Prüfung: 4. 7. 1967	

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Methoden zur Bestimmung von Fruchtwasser	1
pH-Bestimmung	1
Kristallisationsnachweis	2
Zytodiagnostik	2
Die Serumcholinesterase	3
Methoden zur Aktivitätsbestimmung der Serumcholin- esterase	4
Die Acholest-Methode	4
Eigene Untersuchungen	5
Methodik	5
Versuchsgang nach KALOW	6
Ergebnisse	7
Zusammenfassung	7
Nachtrag	9
Literaturverzeichnis	10

Einleitung

Bei einem Viertel aller Schwangeren beobachtet man einen frühzeitigen oder vorzeitigen Blasensprung (R. JASCHKE 1952). Bedenken wir, daß diese Frauen, bei denen ein vorzeitiger Blasensprung vermutet wird, stationär überwacht werden müssen, so ist die exakte Bestimmung von frühzeitigem Fruchtwasser-Abgang von großer klinischer Bedeutung.

Methoden zur Bestimmung von Fruchtwasser

Da während der Schwangerschaft eine Harninkontinenz und ein Fluor genitalis vorkommen, besteht die Schwierigkeit der Unterscheidung zwischen abgehendem Urin, Fluor und Fruchtwasser.

Beim Auftreten einer größeren Menge an Flüssigkeit ist die Entscheidung nicht allzu schwer, denn durch Prüfung der Vorlage oder Spekulemeinstellung ist das Fruchtwasser als solches leicht zu erkennen. Ebenso ermöglichen die Injektion von Methylblau oder Indigokarmin die Identifikation des Abfließenden als Urin.

Die Problematik liegt in der Differenzierung bei dem Vorkommen von kleinen Mengen Flüssigkeit.

Zum Nachweis von Fruchtwasser auch bei kleinem Fund wurden mehrere Methoden beschrieben, die auf verschiedenen Prinzipien beruhen:

1. pH-Bestimmung

Eine sehr einfache Methode wurde von GOLD (1927) vorgeschlagen. Sie stützt sich auf den hohen pH-Wert des Fruchtwassers. Mit Lackmuspapier oder Bromthymolpapier wird das pH der Flüssigkeit bestimmt. Ein hoher pH-Wert gilt als der Nachweis von Fruchtwasser.

Diese Methode ist sehr unzuverlässig, da Urin und Fluor nicht selten einen hohen pH-Wert aufweisen. S.A. GALL und W.N. SPELLACY (1964) fanden kürzlich, daß die Zuver-

lässigkeit dieses Verfahrens bei nur 82,6% liegt.

2. Kristallisationsnachweis

Dieser Test ist auch unter dem Namen "Farnkraut-Phänomen" bekannt (L. NEUHAUS 1956).

Er basiert auf einer Bildung von charakteristischen Kristallformen, die nach der Austrocknung von Fruchtwasser auf einem Objektträger im Mikroskop gut zu erkennen sind.

Der Vorteil dieser Methode besteht wieder in der einfachen Durchführung und in der leichten Unterscheidung von Urin, der andere Kristallisations-Phänomene zeigt. Da aber der Cervixschleim auch während der Schwangerschaft in gleicher Weise wie das Fruchtwasser "arborisiert" (B.E. URDAN und A.M. KURZON 1957; J.C. ULLERY, N. LIVINGSTON und E.H. ABOU-SHABANAH 1959), garantiert der Kristallisationsnachweis nicht eindeutig das Erkennen des Fruchtwassers.

3. Zytodiagnostik

Mehrere Methoden gehen von dem Nachweis foetaler Bestandteile aus. Während eine ältere Methode Fruchtwasser aus dem Vorhandensein von Lanugohaaren folgert (E. PHILIPP 1929), bedienen sich mehrere Verfahren verschiedener Darstellungen von foetalen Epithelien (W. LANGREDER 1952).

KITTRICH (1963) beschrieb eine Färbung mit Nilblau, die CRETIUS (1964) für recht zuverlässig hält.

S.A. GALL und W.N. SPELLACY (1964) schlagen eine zytologische Färbung mit Pinacyanolchlorid vor, mit deren Hilfe sie Fruchtwasser mit 94 prozentiger Sicherheit bestimmen konnten.

Die Zytodiagnostik ist unter den heute zur Verfügung stehenden Methoden die genaueste; sie ist jedoch umständlich und setzt beim Untersuchenden längere Erfahrung voraus.

Kürzlich wurde ein Nachweis für Fruchtwasser vorgeschlagen, der auf einem neuen Prinzip begründet ist. Das Vorhandensein von Fruchtwasser wird durch den Nachweis eines Enzyms, Serumcholinesterase, das sich im Fruchtwasser befinden soll, bewiesen (S. STOJANOV 1964).

Was ist die Serumcholinesterase und wie wird sie nachgewiesen?

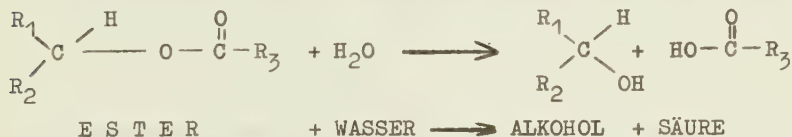
Die Serumcholinesterase

Im Serum kommen zwei Cholinesterasen vor, eine "spezifische" Azetylcholinesterase und eine "unspezifische" Cholinesterase.

Während die spezifische Azetylcholinesterase nur Azetylcholin verseift, verseift die unspezifische Esterase Ester verschiedener Fettsäuren. Wegen dieser ihrer Eigenschaft, verschiedene Substrate zu spalten, erhielt die Serumcholinesterase (SCHE) mehrere Bezeichnungen: "Aspirin-Esterase", "Procain-Esterase", "Tributyrylase", "Pseudo-Cholinesterase" und neuerdings "Serumcholinesterase". Es handelt sich dabei um ein und dasselbe Enzym, das in allen tierischen Organen und Geweben vorkommt (R. RICHTERICH 1961), nicht dagegen im Speichel, Urin und in der Milch (R. AMMON und W. DIRSCHEL 1960).

Es ist noch nicht geklärt, ob es sich bei der unspezifischen Serumcholinesterase um ein Enzymgemisch oder ein einziges Enzym handelt.

Die SCHE verseift Ester organischer Säuren nach der Formel:



Die Funktion des Enzyms im Stoffwechsel ist nicht bekannt. Es spielt aber höchstwahrscheinlich eine Rolle bei der Detoxikation von bestimmten Pharmaka wie Procain, Succinyl-

Cholin und Azetylsalizylsäure.

Das Enzym ist ein α_2 - Globulin mit einem Molekulargewicht um 165 000. Als Bildungsstätte wird die Leber angenommen. "Dafür spricht die enge Parallelität des Verhaltens des Albumins und der Cholinesterase, die wahrscheinlich durch einen ähnlichen Eiweiß-synthetisierenden Mechanismus in den Leber-Parenchymzellen produziert werden" (R. RICHTERICH 1961).

Methoden zur Aktivitätsbestimmung der Serumcholinesterase

Zur Aktivitätsbestimmung der SCHE wurden mehrere Methoden entwickelt:

1. titrimetrisch
2. manometrisch
3. elektrometrisch
4. spektrophotometrisch
und als neueste
5. eine Papiertestmethode. ("Acholest-Methode").

Die Acholest-Methode:

Bei dieser Methode (SAILER und BRAUNSTEINER 1959) handelt es sich um Papierstreifen, die unter dem Namen "Acholest" im Handel sind. Sie sind mit einem Cholinester als Substrat für das Ferment und einem geeigneten Indikator imprägniert. Die im Serum enthaltene Cholinesterase spaltet das Substrat, wobei Säure freigesetzt wird. Benetzt man das Testpapier mit dem zu untersuchenden Serum, so färbt sich das Papier blaugrün. Die bei der Reaktion freiwerdende Säure bewirkt einen pH-Abfall, der eine allmähliche Farbänderung des Indikators von blaugrün über gelbgrün bis gelb hervorruft.

Die Substratspaltung verläuft in quantitativer Abhängigkeit von der Fermentaktivität. Das Zeitintervall (in Minuten) zwischen dem Kontakt des Serums mit dem Testpapier und der Übereinstimmung der Farbe mit derjenigen des jeder Packung beigegebenen Vergleichsfarbstreifens gilt als Maß für die Cholinesterase-Aktivität. Je länger also die Reaktion dauert, umso geringer ist die SCHE-Aktivität.

Die Acholest-Methode zeigte in mehreren Vergleichsversuchen mit anderen Verfahren verschiedene Übereinstimmungen:

Zulema JABSA, M. SCHÖNFELDER und H. BREUER (1961), die diesen Test mit dem manometrischen nach AFMON (1934) verglichen, fanden: "Die Fehlerbreite der Testpapiermethode ist relativ groß". RICHTERICH (1961) berichtet: "Vergleichsbestimmungen von mehreren Seren mit dem Acholest und mit einer potentiometrischen Methode ergaben eine gute Übereinstimmung der Resultate." Trotz dieser Verschiedenheiten wird die Papiertestmethode mit Erfolg in vielen Kliniken zur SCHE-Aktivitätsbestimmung benutzt.

Diese einfache und schnelle Methode, die auch von ungelernten Kräften durchgeführt werden kann, wurde, wie schon erwähnt, von STOJANOV (1964) zum Nachweis von SCHE im Fruchtwasser benutzt. Er bestimmte das Enzym im Fruchtwasser rein qualitativ.

Die neue Nachweismethode von Fruchtwasser hätte eine große Bedeutung bei der Differentialdiagnose von frühem Fruchtblasensprung, da bei der kleinen Menge Flüssigkeit, die von der Scheide bei Verdacht auf Blasensprung zu entnehmen ist, mit dieser Methode einfach und schnell bestimmt werden kann, ob es sich dabei um Fruchtwasser handelt oder nicht.

Die vorliegende Arbeit hat sich zur Aufgabe gestellt, die Zuverlässigkeit des Acholest-Tests bei dem Nachweis von Fruchtwasser zu prüfen.

Eigene Untersuchungen

Methodik:

Es wurde Fruchtwasser von 80 Gebärenden getestet, wobei darauf geachtet wurde, daß keinem der Fruchtwasser bei seiner Gewinnung Blut beigemischt war.

Das klare Fruchtwasser wurde auf das Testpapier zur Untersuchung aufgetragen. Nach den Vorschriften des Tests hätte, falls SCHE im Fruchtwasser enthalten wäre, der Papierstreifen erst blaugrün werden (pH im alkalischen Bereich) und dann allmählich gelbgrüne Farbe annehmen müssen (pH im sauren Bereich).

Nachdem bei 80 Untersuchungen der Papierstreifen eine blau-

grüne Farbe annahm und nicht, wie erwartet, ins Gelbgrüne überging, wurde unter genau denselben Bedingungen der Test mit zentrifugiertem Serum versucht. Dieser Test zeigte die erwartete Reaktion. Damit wurden eigene Fehler bei der Durchführung des Acholest-Testes ausgeschlossen.

Nachdem die Bestimmungsmethode nach STOJANOV nicht reproduzierbar war, wurde der Versuch gemacht, die SCHE-Aktivität im Fruchtwasser durch eine genauere Methode quantitativ zu bestimmen. Es sollte festgestellt werden, ob die vorhandene SCHE-Aktivität zur Durchführung des Acholest-Testes ausreicht (siehe Nachtrag).

50 der 80 Proben wurden mithilfe der spektrometrischen Methode nach KALOW (1955) gemessen.

Versuchsgang nach KALOW:

Als Substrat wird eine Benzoyl-Cholin-Verdünnung verwendet, die bei 240 m μ ein Absorptionsmaximum aufweist. Die SCHE-Aktivität in einer Fruchtwasser-Verdünnung zeigt sich in einer laufenden Abnahme der Extinktion, die über 3 min. verfolgt wird.

Das Fruchtwasser wurde mit einem 1/15 M Phosphatpuffer (pH = 7,4) 1 : 10 verdünnt. Hiervon wurden 2 ml in eine Quarzküvette (1 cm Schichtdicke) pipetiert, mit 1 ml des Phosphatpuffers und 1 ml einer 2×10^{-4} M Benzoylcholinlösung versetzt.

Es wurde sofort die Extinktionsabnahme - bei einer Wellenlänge von 240 m μ - mit einem Spektrometer (BECKMAN DU) gegen einen Blindwert gemessen. Der Blindwert enthält 2 ml der Ausgangsverdünnung und 2 ml Phosphatpuffer (pH = 7,4).

Aus der Extinktionsabnahme über 3 min. wurde die SCHE-Aktivität in M/ml/h ($t = 37^{\circ}$ C.) berechnet.

Eine Extinktionsabnahme von 0,165 E entspricht der Hydrolyse von 0,025 μ M Benzoylcholin pro ml.

Der ermittelte Wert wurde wegen der 1 : 10 Verdünnung des Fruchtwassers mit 10 multipliziert, um auf 1 ml zu kommen,

außerdem mit 20, um 1 h zu bekommen.

Die Messung, die bei einer bestimmten Temperatur stattfand, mußte auf 37° C. korrigiert werden. Die unmittelbar nach der Messung bestimmte Temperatur in der Küvette wurde zunächst auf 26° korrigiert. Nach der Formel $\text{antilog } 0,0283 (26 - t)$ ergab sich ein Faktor, mit dem die bei einer Temperatur zwischen 20° und 26° bestimmte Aktivität multipliziert wurde, um auf die Aktivität bei 26° zu kommen.

Die Multiplikation dieses Wertes mit 1,74 ergab schließlich die Aktivität bei 37° .

Da die SCHE-Aktivität, die mit der KALOW-Methode bestimmt wird, in der Literatur in Einheiten von $\Delta E \cdot 1000 / 3 \text{ min}$ ($t = 26^{\circ}$) (Extinktionsabnahme über 3 min, multipliziert mit 1000 bei einer Temperatur von 26°) angeführt wird, werden hier die Ergebnisse sowohl in M/ml/h (37° Temp.) als auch in $\Delta E \cdot 1000 / 3 \text{ min}$ ($t = 26^{\circ}$) angegeben.

Ergebnisse:

Bei der Aktivitätsbestimmung von SCHE im Fruchtwasser fanden sich bei 50 Fruchtwasser-Proben Aktivitäten, die alle zwischen $0,1363 - 0,3688 \mu\text{M} / \text{ml} / \text{h}$ ($t = 37^{\circ}$) lagen. Das entspricht $0,3 \Delta E \cdot 1000 / 3 \text{ min} - 0,7 \Delta E \cdot 1000 / 3 \text{ min}$ ($t = 26^{\circ}$).

Die physiologischen Werte für SCHE im Serum liegen zwischen $42 - 72 \mu\text{M}/\text{ml}/\text{h}$ ($t = 37^{\circ}$) bzw. $80 - 150 \Delta E \cdot 1000/3 \text{ min}$ ($t = 26^{\circ}$).

Zusammenfassung

Die Nachweismethode für Fruchtwasser mithilfe des Acholest ist nicht reproduzierbar.

Durch parallele erfolgreiche SCHE-Bestimmung im Serum mit derselben Methode ist die Exaktheit der Testdurchführung gewährleistet.

Mithilfe der spektrometrischen Methode nach KALOW wurde die SCHE-Aktivität im Fruchtwasser bestimmt. Die Aktivität liegt

in den hier durchgeführten Untersuchungen ca. 250 x tiefer als im Serum.

Daraus läßt sich schließen, warum die SCHE im Fruchtwasser mit Acholest (ohne Benutzung eines feuchten Thermostaten - s. Nachtrag -) nicht zu fassen ist.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß unsere Versuche unter so günstigen Bedingungen durchgeführt wurden, wie sie der Praktiker selten antrifft. Es stand jeweils Fruchtwasser in größerer Menge zur Verfügung, dem kein Serum beigemengt war.

Nachtrag

Zur Zeit meiner Untersuchungen war mir eine zweite Arbeit von STOJANOV (1964) mit dem Titel "Cholinesterase im Fruchtwasser" nicht zugänglich.

In dieser seiner Arbeit bestimmte er die SCHE-Aktivität in Fruchtwasser mit dem Acholest, indem er die mit Fruchtwasser benetzten Papierstreifen in einem feuchten Thermostaten ($t = 20^{\circ}$) legte.

Er ermittelte eine 50 x kleinere Aktivität im Fruchtwasser als im Serum.

Die SCHE-Aktivität im Fruchtwasser ist also auch nach STOJANOV so niedrig, daß sie mit dem Acholest wie in seiner ersten Arbeit beschrieben nicht faßbar ist, so daß die praktische Bedeutung dieser Methode sehr gering ist.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- AMMON, R. und DIRSCHERL, W. Fermente, Hormone, Vitamine.
Thieme, Stuttgart 1960³, Bd. II,
S. 737.
- CRETIUS, V. Die Geburt. Klinik der Frauenheil-
kunde und Geburtshilfe, SCHWALM, H.
und DÖDERLEIN, G. (Hgg.). Urban
und Schwarzenberg, München-Berlin
1964, Bd. II, S. 407.
- DOENICKE, A. und HOLLE, F. Das Verhalten der Leberfunktion im
postoperativen Schock. Fortschr.
Med. 80 (1962), S. 253-258.
- GALL, S.A. und SPELLACY, W.N. Cytologic diagnosis of ruptured
membranes. Obstet. and Gynec. 24
(1964), S. 732-736.
- GOLD, V. Zur Diagnose des Blasensprunges.
Zbl. Gynäk. 51 (1927), S. 1491-
1493.
- JABSA, Zulema, SCHÖNFELDER, M. und BREUER, H.
Vergleich zwischen der manometri-
schen und Testpapier-Methode zur
Bestimmung der Cholinesterase-Akti-
vität im Serum. Klin. Wschr. 39
(1961), S. 966-968.
- JASCHKE, R.Th. von. Die normale Geburt. Biologie und
Pathologie des Weibes, SEITZ, L.
und AMREICH, A.I. Urban und Schwar-
zenberg, Berlin, Innsbruck, München,
Wien 1952², Bd. VII, S. 596-597.
- KALOW, W. und LINDSAY, H.A. A comparison of optical and mano-
metric methods for the essay of
human serum cholin esterase. Canad.
J. Biochem. 33 (1955), S. 368 (zit.
nach DORNICKE und HOLLE 1962).

- KITTRICH, M. Zytodiagnostik des Fruchtwasserabflusses mit Hilfe von Nilblau. Z. Geburtsh. (Stuttg.) 16 (1956), S. 856.
- LANGREDER, W. Zur Zytologie des Fruchtwassers. Zschr. Geburtsh. (Stuttgart) 136 (1952), S. 136-148.
- NEUHAUS, L. Einfaches und schnelles Verfahren zum Fruchtwassernachweis nach Blausprung. Z. Geburtsh. (Stuttg.) 16 (1956), S. 856-862.
- PHILIPP, E. Zur Diagnose des vorzeitigen Blausprunges. Zbl. Gynäk. 53 (1929), S. 1618.
- RICHTERICH, R. Enzym-Diagnostik für den praktischen Arzt. I SCHE. Praxis 50 (1961), S. 624-626.
- SAILER, S. und BRUNSTEINER, H. Über eine neue, sehr einfache Methode zur Bestimmung der Serumcholinesterase-Aktivität und ihre klinische Bedeutung. Klin. Wschr. 37 (1959), S. 986-990.
- STOJANOV, S. Neue einfache und schnelle Methode zur Bestimmung des Fruchtwassers. Zbl. Gynäk. 86 (1964), S. 848-850.
- STOJANOV, S. Cholinesterase im Fruchtwasser. Zbl. Gynäk. 86 (1964), S. 1842-1844.
- ULLERY, J.C., LIVINGSTON, N. und ABOU-SHABANAH, E.H. The mucous fernphenomenon in the cervical and nasal smears; a review and current concept of abortifacient. Obstet. gyn. Survey. 14 (1959), S. 1-25.

URDAN, B.E. und KURZON, A.M. Cyclic changes of cervical mucus.
II clinical application. Obstet.
a. Gynecol. 10 (1957). S. 34-39.

An dieser Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med.
G. Martius für die Überlassung des Themas, Herrn
Doz. Dr. med. A. Doenicke für die Überlassung der
Apparatur und nützliche Ratschläge und den Herren
Dr. med. E. Kuß und Dr. med. S. Keck für ihre Hilfe
bei der Abfassung der Arbeit.

Lebenslauf

Ich, Michael Inbar, wurde am 11.1.1937 als Sohn des Kaufmanns Julius Seligsberg und seiner Ehefrau Madeleine geborene David in Tel Aviv/Israel geboren.

Meine Kindheit und Jugend verbrachte ich teils bei meinen Eltern in Tel Aviv, teils im Kibuz, wo ich auch die Volksschule und das Gymnasium besuchte.

Nachdem ich im Jahre 1957 von meinem dreißig monatigen Militärdienst entlassen war, kehrte ich in das Kibuz zurück.

Ende 1959 schied ich aus dem Kibuz aus, um Medizin zu studieren. Zu diesem Zweck bereitete ich mich für eine externe Reifeprüfung vor, die ich im März 1961 bestand.

Im Sommer-Semester 1961 begann ich mein Medizin-Studium in Freiburg i. Brsg. , wo ich im Frühjahr 1962 das Vorphysikum und im Herbst 1963 das Physikum ablegte.

Seit dem Sommer-Semester 1964 studiere ich in München.

Hier schloß ich das Medizin-Studium am 29. Juni 1967 mit dem Staatsexamen ab.

